

# 人体におけるガラクトサミニダーゼの組織化学的研究

著者	佐藤 勝久
号	675
発行年	1970
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/18780">http://hdl.handle.net/10097/18780</a>

氏 名 ( 本 籍 )                      さ                      と う                      か つ                      ひ さ  
佐                      藤                      勝                      久

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医   博   第   6 7 5   号

学位授与年月日                      昭 和 4 5 年 3 月 2 5   日

学位授与の要件                      学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程                      東北大学大学院医学研究科  
( 博士課程 ) 外科学系専攻

学位論文題目                      Histochemical Studies on N-acetyl-  
 $\beta$ -galactosaminidase in the human  
bodies  
( 人体におけるガラクトサミニダーゼの組織  
化学的研究 )

( 主   査 )

論文審査委員   教授   九   嶋   勝   司   教授   森                      富

教授   笹   野   伸   昭

## 論文内容要旨

N-acetyl- $\beta$ -galactosaminidase(以下 $\beta$ -GA)及びN-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase(以下 $\beta$ -GL)はムコ多糖体の中心構成単糖であるN-acetyl-galactosamine, N-acetyl-glucosamineの $\beta$ -glycosideの加水分解を触媒する酵素で、アミノ糖を含む粘液物質、例えば、ヒアルロン酸コンドロイチン、キチン、糖蛋白質、血液型物質及び粘液質の代謝に関与すると云われている。

$\beta$ -GAに関しては、生体内におけるその存在が生化学的に確認されているが、組織化学的研究はなされておらず、本酵素の染色法も報告されていない。そこで、 $\beta$ -GAの組織化学的証明を試み、同時アゾ色素合法で、本酵素の染色方法を確立した。

$\beta$ -GAの組織化学的証明；新鮮な組織片(5×5×5mm以下)をformol calcium液に、4℃で24時間固定し、次いでHoltsのgum-succrose液で4℃、24時間保存する。組織片をdry ice-acetoneで-20℃で凍結、10Mの連続切片を作成した。切片を0℃のethanolに5分間浸し、水洗、4℃の蒸留水に保存する。本酵素の染色には基質としてNaphthol AS-BIN-acetyl- $\beta$ -galactosaminideを用い、この0.25m $\mu$ を有機溶媒N,N-dimethyl formamide 0.5mlに溶解した。チアゾ試薬としてhexazonium pararosaniline 1.8mM、緩衝液として、クエン酸リン酸緩衝液pH 4.4を用い、反応液を作成した。反応液のpH 4.4に滴定し、切片を37℃で60分間incubateした。本酵素は、原形質内に赤褐色、ビマン性、微細顆粒状の沈澱として認められた。

$\beta$ -GLの染色は、林の方法を用いた。卵巣及び子宮頸における $\beta$ -GA及び $\beta$ -GLの組織化学的検索を行った。

卵巣の組織化学：月経周期の正常な婦人の卵巣32例を用いた。卵巣では、卵胞、黄体にのみ活性が現れた。 $\beta$ -GA、 $\beta$ -GLとも同じ分布を示したが、活性度は $\beta$ -GAより $\beta$ -GLの方がやや強かった。卵胞では、原始卵胞には $\beta$ -GA、 $\beta$ -GLとも活性はなかつたが、発育卵胞、成熟卵胞では、内葉膜層にのみ活性が存在し、この部の活性は、卵胞の増大とともに強くなつた。しかし顆粒膜層には活性が現れなかつた。月経黄体では、その初期、すなわち、増殖期に至つて、微弱陽性に顆粒膜層に活性が現れた。顆粒膜層での活性は、血管新生期に増強し、開花期に最高になり、退行期には徐々に減少した。一方、黄体莢膜層での活性は、黄体各期を通じて一様に弱陽性を示した。この事実から、卵胞におけるestrogenの分泌と $\beta$ -GA、 $\beta$ -GLとの間には、密接な関連があるものと考えられる。開花期黄体の顆粒膜層において、これらの酵素活性が最も高

くなることは、この時期に progesterone の分泌が最も活発に行われていると云う事実とよく一致する。又、莖膜層での活性が黄体期全体を通じて弱い、一定に維持されているのは、ここで estrogen の分泌が引き続き行われているのだという意見とよく一致している。

子宮頸の組織化学：子宮頸癌の手術で摘出した子宮頸23例及び子宮筋腫で摘出した正常子宮頸8例の計31例を用いた。 $\beta$ -GA,  $\beta$ -GLとも、正常子宮頸部扁平上皮組織及び上皮下組織には、活性がなかつたが、正常頸部円柱上皮細胞では $\beta$ -GAは弱陽性を、 $\beta$ -GLは中等度陽性を示した。細胞内での $\beta$ -GA,  $\beta$ -GL活性の局在は、いずれも核では陰性であり、基底に遠い細胞質の部分だけが陽性であつた。

子宮頸癌組織における $\beta$ -GA,  $\beta$ -GLの分布の特色は、両酵素とも癌細胞巢及び癌周囲間質に、散在性に活性が出現することである。癌巢から遠く離れた間質には認められなかつた。癌周囲間質の陽性物質は、細顆粒状であり、分葉核を有する遊走細胞の原形質に一致するとき分布を示した。これを連続切片による他の染色方法を比較検討してみると、本遊走細胞は、肥胖細胞であろうと考えられた。 $\beta$ -GA,  $\beta$ -GLの染色に用いた子宮頸癌24例をH・E標本でCPL分類に従つて5型に分類した。その内容は、C型7型、CPⅠ型4例、CPⅡ型4例、PⅢ型7例、PⅢL型1例である。

癌巢内における陽性物質は、主として、癌巢の中心部に著明で、癌巢の辺縁にはあまりみられなかつた。中心部の陽性物質は明らかに癌細胞の原形質内に存在していた。癌実質では、各症例による $\beta$ -GA,  $\beta$ -GL活性陽性癌細胞数の差はあまりみられなかつた。同一標本、同一巢内でやゝ陽性細胞数の多い部分、やゝ少ない部分がみられたが、癌の未熟と成熟とは、無関係であつた。H・E標本によるCPL分類とも、一定の関連は見出せなかつた。

癌周囲間質では、 $\beta$ -GA,  $\beta$ -GLは癌の悪性度に関し、極めて興味ある所見を示した。酵素活性陽性細胞数は、CPL分類のC型では、癌周囲に極めて多く、癌実質周囲に広く散在していた。CPⅠ型、CPⅡ型となるに従つて、本細胞数は徐々に減少し、散在する部位も狭くなつた。PⅢ型では、本細胞数は極めて少なく、癌実質の近くに点在しており、症例によつては本細胞の全くみられないものもあつた。この事実は、明らかに、癌の発育が間質の態度如何によるものであるという今井、赤崎の見解と一致するものである。癌周囲間質では、本酵素量はCPL分類と密接な関連が認められ、 $\beta$ -GA,  $\beta$ -GLは、癌の増殖、侵襲に抵抗性をもつものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ムコ多糖体の構成単糖である N-acetyl-galactosamine, N-acetyl-glucosamine の  $\beta$ -glycoside の加水分解を触媒する N-acetyl- $\beta$ -galactosaminidase (=  $\beta$ -GA) および N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (=  $\beta$ -GL) を卵巣および癌組織につき組織化学的に検討すべく、この研究を行つた。

$\beta$ -GA を組織化学的に証明する方法はまだ存在しないので、次の方法でこれを開発した。すなわち、基質として Naphtohol AS-BIN-acetyl- $\beta$ -galactosaminide を用い、この 0.25 m $\mu$  を有機溶媒 N, N-dimethyl formamide 0.5ml に溶解した。ジアゾ試薬として hexazonium pararosaniline 1.8mM. 緩衝液としてクエン酸磷酸緩衝液 pH 4.4 を用い反応液を作成した。被検組織は新鮮なものを formol calcium 液に 4℃ 24 時間固定し、次いで Holts の gum-sucrose 液で 4℃, 24 時間保存する。この組織を dry ice-acetone で -20℃ で凍結、10 M の連続切片を作成した。染色液に当たり反応液の pH を 4.4 とし、切片をこれに 37℃ で 60 分 incubate した。本酵素は原形質内に赤褐色、ヒマン性または微細顆粒状の沈澱として認められた。

$\beta$ -GL の染色は林の方法を用いた。

- 1) 卵巣は月経周期正常な婦人 32 例から得たものについて染色した。両酵素とも卵胞と黄体のみに認められ、活性度は  $\beta$ -GA の方が  $\beta$ -GL の方がやや強かつた。原始卵胞には両酵素とも活性がなく、発育卵胞、成熟卵胞では内卵胞膜のみに活性があり、卵胞の増大と共に活性も強まつた。月経黄体では、増殖期に顆粒膜層で微弱陽性となり、血管新生期に増強し、開花期に最強となり、退行期には徐々に減少した。 $\beta$ -GA,  $\beta$ -GL は卵胞における estrogen, 黄体における gestagen の分泌と関連があるものと推定される。
- 2) 子宮癌組織では  $\beta$ -GA,  $\beta$ -GL とも癌細胞巣および癌周囲間質に散在性に認められ、癌巣を遠く離れたところには認められなかつた。癌周囲組織の陽性物質は他の染色切片と対比してみると肥胖細胞と一致した。また、これら両酵素の活性度は癌周囲組織の抵抗力と比例する CPL 分類と密接な関係があることが判つた。

以上、 $\beta$ -GA の組織化学の開発、そのホルモン分泌、癌周囲組織の抵抗性と平行することをつきとめたユニークな研究で、学位授与に価するものと判定した。